OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

55.

O. VERONA e G. LUCHETTI

Sulla scissione microrganica di alcuni glucosidi

Estratto dal *Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa*,
Volume VII - Anno 1931.

PISA: TIP. EDITRICE MARIOTTI PACINI 1931 (X)
EMILIO PACINI, Successore

O. VERONA e G. LUCHETTI

Sulla scissione microrganica di alcuni glucosidi

XXXI

O. VERONA e G. LUCHETTI

Sulla scissione microrganica di alcuni glucosidi

(*Giunta il 13 novembre 1931 - X*)

I glucosidi, è noto, sono particolari sostanze chimiche più o meno diffuse negli organismi, che risultano dalla condensazione anidridica di uno zucchero, generalmente glucosio, con un corpo di natura alcoolica o fenolica.

Nell' organismo vegetale si trovano presenti in tutti gli organi della pianta, eccettuato il seme, che ne è talvolta sprovvisto, con localizzazione varia, raramente specifica, aventi probabilmente funzione antitossica rispetto a sostanze che, se libere, provocherebbero avvelenamento.

I glucosidi, per azione o degli acidi deboli o di particolari enzimi denominati « glucosidasi », soggiacciono alla scissione idrolitica con conseguente liberazione dei loro cocostituenti : il decorso del fenomeno è abbastanza ben noto (1).

La presenza di tali enzimi è stata accertata nel succo vegetale di numerose piante ed anche in alcuni microrganismi, batteri e funghi.

Tralasciando di ricordare quanto sulle prime ci è noto, cercheremo di riassumere le esperienze relative alla scissione microrganica dei glucosidi e specialmente dell'arbutina, fluo-

rizina e salicina, essendo questi i composti sui quali sono state condotte le esperienze di cui qui si viene a riferire.

= L' arbutina è ammesso si decomponga secondo l'equazione seguente:

$$\underset{\text{arbutina}}{HO \cdot C_6H_4 \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{idrochinone}}{HO \cdot C_6H_4 \cdot OH} + C_6H_{12}O_6$$

Capaci di scissione, al riguardo, furono segnalati *Aspergillus niger* da Bourquelot e Hèrissey (2); batteri indeterminati, da Van der Leck (3); da Gonnermann (4), batteri dell' intestino; da Twort (5), *Bact. acidi lactici, coli,* ed altri isolati ancora dall' intestino; da Dox (6), *Pen. Camembertii;* da Brunstein (7), *Asp. oryzae, Asp. Wentii, Botrytis cinerea* e *Pen. glaucum;* da Henry e Auld (8), alcuni fermenti; da Weintraub (9), infine, numerosi stipiti di *B. coli.*

= La fluorizina subisce anch' essa l' idrolisi secondo lo schema:

$$\underset{\text{fluorizina}}{C_6H_2(OH)_3 \cdot CO \cdot CH(CH_3) \cdot C_6H_4 \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5} + H_2O \longrightarrow$$

$$\underset{\text{fluoretina}}{C_6H_2(OH)_3 \cdot CO \cdot CH(CH_3) \cdot C_6H_4OH} + C_6H_{12}O_6$$

Il fatto è stato accertato per *Asp. niger* da Bourquelot e Hèrissey, per *Pen. Camembertii* da Dox, per *Bact. pneumoniae, capsulatum, lactis aerogenes, cloacale* da Twort.

= La salicina si idrolizza dando luogo a glucosio e saligenina.

$$C_6H_4 \begin{cases} O - C_6H_{11}O_5 \\ CH_2OH \end{cases} + H_2O = C_6H_4 \begin{cases} OH \\ CH_2OH \end{cases} + C_6H_{12}O_6$$

Risultarono ancora attivi su tale glucoside: *Asp. niger* (Bourquelot e Hèrissey), alcuni fermenti (Henry e Auld), sei forme batteriche, compreso *Bact. coli,* isolate dall' intestino (Twort), *Asp. oryzae* (Brunstein), *Pen. Camembertii* (Dox).

= Sull' amigdalina, la cui scissione avviene secondo lo schema:

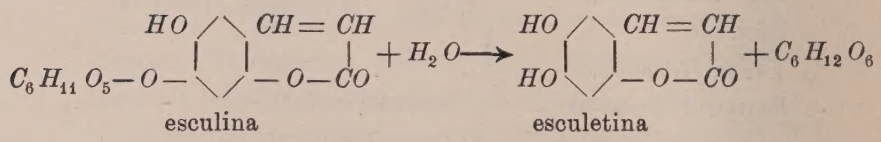
$$\underset{\text{amigdalina}}{C_6H_5\cdot(CN)\,CH(O\cdot C_{12}H_{21}O_{10})} + H_2O = \underset{\text{prunasina}}{C_6H_5(CN)\,CH(O\cdot C_6H_{11}O_5)} + C_6H_{12}O_6$$

sarebbero risultati attivi:

Micr. pyogenes tenuis *Bac. termophilus* *Bact. coli* *Vibrio Metchnikovii*	Fermi e Montesano (1894) (10)
Batteri dello stomaco	— Gèrard (1896) (11)
» dell'intestino	— Twort (1907) (12)
» del gruppo *coli*	— Weintraub (1924) (13)
Fermenti vari	— Henry e Auld (1905) (14) Coldwell e Courtland 1907 (15)
Fusarium culmorum *Streptothrix* sp. *Pseudom. fluorescens* *Bact. coli* » *lactis acidi* » *denitrificans*	Crabill e Reed (1915) (16)
Pen. glaucum	— Gérard (1893) (17)
Asp. glaucus » *niger*	Puriewitsch (1898) (18)
Pen. Camembertii	— Dox (1910) (19)

Amylomyces Couxii *Botrytis cinerea* *Asp. glaucus* » *niger* » *orizae* *Pen. glaucum* *Thamnidium elegans*	Brunstein (1911) [20]
Asp. niger	— Bourquelot (1912) [21] Javillier e Tchernokowtsky (1913) [22]

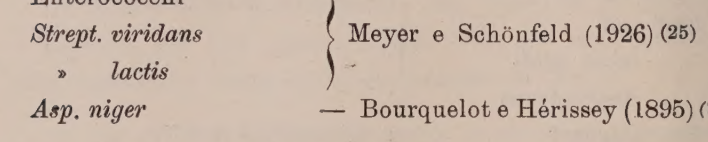
= L' esculina darebbe luogo a esculetina:



e le forme segnalate capaci di scissione sarebbero:

Bact. coli » *aerogenes* *Bac. acido aromaticus*	Van der Leck (1906) [23]
Batteri del tifo	— Harrison e Van der Leck (1909) [24]
Enterococchi *Strept. viridans* » *lactis*	Meyer e Schönfeld (1926) [25]
Asp. niger	— Bourquelot e Hérissey (1895) [26]

= L' indacano formerebbe indossile e glucosio:



e sarebbero risultati attivi:

Bac. indologenes *Bact. pneumoniae* *Bact. rhinoscleromatis*	Alvarez (1887) [27]
Penicilli *Mucor mucedo* *Bac. anthracis* *Bact. prodigiosum* *Sarcina lutea* *Cladothrix odorifera* *Bact. aerogenes*	Molisch (1898) [28]
Bact. coli » *aerogenes* *Bac. acido-aromaticus*	Van der Leck (1906) [29]

= La coniferina darebbe luogo ad alcool coniferilico:

$$\underset{\text{coniferina}}{(C_6H_{11}O_6 \cdot O) \cdot C_6H_3(OCH_3) \cdot CH : CH \cdot CH_2OH} + H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + \underset{\text{alcool coniferilico}}{+ HO \cdot C_6H_3(OCH_3) \cdot CH : CH \cdot CH_2ON}$$

a mezzo di:

Aspergillus niger	— Bourquelot (1895)
Bact. coli » *acidi lactici* » *pneumoniae* » *pyogenes foetidum* » *capsulatum* » *lactis aerogenes* » *cloacae*	Twort (1907)

= La saponina verrebbe idrolizzata in sapogenina, sempre dalle stesse forme; e così i numerosi altri composti glucosidici particolarmente indagati da Twort (1907) (30).

* * *

Quale sia il significato biologico della presenza di tali enzimi nel corpo microrganico non è difficile di presumere ottenendosi come prodotto di idrolisi glucosio, il quale è conosciuto essere, per i microbi, adatta sorgente di carbonio. Le esperienze qui riferite avvalorerebbero tale ipotesi in quanto fu ottenuto sempre maggiore sviluppo microrganico nei substrati contenenti glucosidi — in confronto di altri privi — e non si ebbe, a scissione avvenuta, riduzione del Fehling nei liquidi colturali: il glucosio sarebbe quindi utilizzato come alimento energetico.

Quello che piuttosto rimane apparentemente oscuro è il fatto che dalla scissione dei glucosidi si originano talvolta composti ritenuti venefici come si verifica ad es. nella scissione dell' amigdalina, la quale, dopo avere originato prunanasina e da questa il nitrile mandelico, dà luogo ad acido cianidrico:

$$C_6H_5CH\begin{cases} CN \\ O\cdot C_6H_{10}O_4\cdot O\cdot C_6H_{11}O_5 \end{cases} + H_2O = C_6H_5\cdot CH\begin{cases} CN \\ O\cdot C_6H_{11}O_5 \end{cases} + C_6H_{12}O_6$$

$$C_6H_5\cdot CH\begin{cases} CN \\ O\cdot C_6H_{11}O_5 \end{cases} + H_2O = C_6H_5\cdot CH\begin{cases} CN \\ OH \end{cases} + C_6H_{12}O_6$$

$$C_6H_5\cdot HC\begin{cases} CN \\ OH \end{cases} = C_6H_5\cdot COOH + HCN$$

e della salicina (v. questo lavoro) che dopo trasformata in saligenina si ossida ad acido salicilico:

$$C_6H_4\begin{cases} O-C_6H_{11}O_5 \\ CH_2OH \end{cases} + H_2O = C_6H_4\begin{cases} OH \\ CH_2OH \end{cases} + C_6H_{12}O_6$$

$$C_6H_4\begin{cases} OH \\ CH_2OH \end{cases} = C_6H_4\begin{cases} OH \\ COOH \end{cases}$$

Sta di fattò però che, mentre la scissione può arrestarsi ad uno dei primi stadi, come si verifica per alcune forme, di solito ifomicetiche — ragionevolmente intolleranti della presenza di composti venefici — dall' altra è conosciuta la possibilità di sviluppo che alcuni microrganismi presentano di fronte a tali sostanze, le quali, anzi, verrebbero ulteriormente utilizzate; e si avrà in appresso occasione di trattarne a proposito dell' ossidazione dell' acido salicilico.

Parte sperimentale

Fu necessario preliminarmente accertarsi che la sterilizzazione dei liquidi colturali contenenti glucosidi, non ne provocasse di per sè stessa la scissione.

Constatata la nessuna influenza che il metodo di sterilizzazione adottato esercita sulla idrolisi dell' arbutina, della salicina e della fluorizina contenute nei substrati, fu senz' altro preparato il seguente terreno nutritivo:

acqua distillatata	1000
tartrato ammonico	2
fosfato bipotassico	2
cloruro sodico	tr.
solfato potassico	tr.

glucoside	2
(carbonato di calcio) (*)	1

che distribuimmo in Erlenmeyer e inoculammo con cc. 1 di stemperamento acquoso di 1 terra: 1 acqua. Il materiale di inoculazione fu prelevato da sei tipi caratteristici di suolo e, avuto cura di mantenere per ogni serie di glucosidi alcune Erlenmeyer sterili, coltivammo a 24° C.

Le osservazioni vennero eseguite giorno per giorno onde stabilire, eventualmente, la differente velocità di scissione dei diversi terreni.

Risultò:

	arbutina	*salicina*	*fluorizina*
	—	—	—
	[comparsa dell' idrolisi, dopo giorni]		
Terreno I	2	3	6
» II	3	3	5
» III	6	2	6
» IV	3	4	4
» V	4	5	3
» VI	3	3	4

Ogni terreno sperimentato, adunque, si dimostrò capace di scindere i glucosidi con attività diversa secondo la sua

(*) L'aggiunta di $CaCO_3$ si ritenne opportuna al fine di neutralizzare l' eventuale formazione di acidi da parte delle colture e di impedire reazioni secondarie del mezzo che avrebbero potuto provocare idrolisi di natura chimica. Prove di confronto, istituite parallelamente senza tale aggiunta o, anzichè con $CaCO_3$, con carbonato di soda, dimostrarono che i fatti, comunque, si svolgono in analogo modo.

diversa natura: ciò dovette essere, verosilmilmente, in dipendenza, più che del numero, delle specie microrganiche attaccanti; altrimenti non si spiegherebbe come, ad es., il terreno n. III scindesse più rapidamente di ogni altro la salicina e più lentamente degli altri l'arbutina e la fluorizina e il terreno n. I scindesse subito l'arbutina ed anche la salicina, ma dopo maggior numero di giorni, invece, la fluorizina.

Infatti, contati i germi inizialmente contenuti nel materiale d'inoculazione, risultò:

	N. di germi per grammo di terra
Terreno I	1.450 000
» II	1.020 000
» III	760 000
» IV	980 000
» V	1.100 000
» VI	1.230 000

e ciò è a sostegno di quanto sopra si è esposto.

Il contenuto dei matracci sterili rimase inalterato.

= Ancorchè la scissione dei glucosidi, sia pur non completamente, apparisse per tutti i tipi di terreno entro il 6° giorno, fu ritenuto opportuno di prolungare la coltura fino al 15° giorno. E ciò in quanto, essendosi parallelamente coltivata una serie di Erlenmeyer non contenenti nel liquido colturale glucosidi, ci si poteva accertare del valore trofico di questi. Infatti, a mezzo dell'esame macroscopico, fu agevole di notare come le colture, presenti glucosidi, si mostrassero più rigogliose, non solo, ma tanto maggiore fu il progresso di esse quanto maggiore si dimostrò la velocità di scissione.

Inoltre, il Fehling non ridotto per aggiunte di aliquote dei liquidi colturali dimostrò la ulteriore utilizzazione del glucosio da parte delle colture, le quali debbono a questo composto il maggiore sviluppo dimostratosi.

= Conseguentemente si è voluta indagare l'azione che sulla scissione dei glucosidi esercitano le condizioni alimentari dei microbi, più particolarmente avendosi riguardo alle sorgenti carboidrate e azotate.

In un caso allestimmo il seguente liquido colturale:

acqua distillata	1000
tartrato ammonico	2
fosfato bipotassico	2
cloruro di sodio solfato di potassio	tr.
carbonato di calcio	1
glucoside	2

e ad esso fu aggiunto, nelle proporzioni del 2 %, glucosio o saccarosio o lattosio o galattosio: in altri recipienti di controllo non fu aggiunta alcuna sorgente carboidrata.

Inoculammo e coltivammo come di solito, desumendo l'azione favorente o ostacolante degli zuccheri della rapidità di scissione dei glucosidi:

	arbutina	*salicina*	*fluorizina*
	—	—	—
	[comparsa dei composti di idrolisi, dopo giorni:]		
Controllo	5	4	7
glucosio	10	7	12
galattosio	11	8	12
saccarosio	15	9	16
lattosio	15	9	18

La scissione dei glucosidi avvenne, adunque, prima nei liquidi non contenenti alcuna sorgente carboidrata. Gli zuccheri si dimostrarono quindi ostacolanti il fenomeno, e particolarmente i disaccaridi, per la loro lenta combustibilità.

L' azione delle diverse sorgenti azotate fu indagata aggiungendo al seguente substrato:

acqua distillata	1000
fosfato bipotassico	2
cloruro di sodio solfato di potassio	tr.
carbonato di calcio	1
glucoside	2

o asparagina, o urea, o tartrato ammonico, o nitrato potassico o solfato ammonico nelle proporzioni pari a gr. 0.3252 $^0/_{00}$ di N. Alcune colture di controllo furono lasciate prive di sorgente azotata.

Inoculammo e coltivammo come in precedenza, avendo cura di allestire in pari tempo e lasciare sterile un' altra serie di Erlenmeyer preparate in analogo modo. Mentre nei liquidi sterili non si determinò alcuna scissione di glucosidi, in quelli presenti colture microbiche risultò:

	arbutina	*salicina*	*fluorizina*
	—	—	—
	[comparsa dei composti di idrolisi, dopo giorni:]		
Controllo	20	15	25
asparagina	9	6	12
urea	7	6	13
tartrato ammonico	7	7	12
nitrato potassico	5	3	7
solfato ammonico	4	3	6

La presenza di azoto nei liquidi colturali favorisce talvolta grandemente la scissione di glucosidi: in particolar modo, poi, quando la sorgente azotata sia rappresentata da solfato ammonico o nitrato potassico.

= Ritenuta ostacolante, per le prove di cui sopra, la presenza di carboidrati e favorente, per contro, la presenza di composti di azoto, con il liquido così costituito:

acqua distillata	1000
solfato ammonico	1,5
fosfato bipotassico	2
cloruro di sodio	tr.
solfato di potassio	tr.
carbonato di calcio	1
glucoside	2

provammo la capacità e velocità di azione di alcune forme microbiche isolate in coltura pura. Alcune di queste, invero, furono da altri, in precedenza sperimentate (v. p. 4-8) e sempre con risultati positivi. Ciò non pertanto il ripetere l'esperienza avrebbe giovato ad una migliore conoscenza del fatto in quanto — si è avuto occasione di vederlo per alcune forme batteriche — la capacità e la velocità di attaccare uno stesso composto glucosidico può variare a seconda dei diversi stipiti anche per una medesima specie.

I risultati ottenuti sono stati consegnati nella seguente Tabella:

Microrganismi:	arbutina										salicina										fluorizina									
	giorni occorsi per la comparsa dei composti di idrolisi:																													
	3	4	5	7	10	12	15	20	25	30	3	4	5	7	10	12	15	20	25	30	3	4	5	7	10	12	15	20	25	30
Bact. fluor. liquef. 1	—	—	—	—	+						—	—	—	—	—	—	+				—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» » » 2	—	—	—	—	—	+					—	—	—	—	+						—	—	—	—	—	—	—	+		
» *coli* 1	—	—	—	—	—	—	—	+			—	—	—	—	—	—	—	+			—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
» » 2	—	—	—	—	—	—	+				—	—	—	—	—	—	—	+			—	—	—	—	—	—	—	—	—	?
Proteus vulgaris	—	+									—	+									—	—	—	—	+					
Bact. discoformans	—	+									—	+									—	—	+							
» *punctatum* 1	—	—	—	—	+						—	—	—	+							—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» » 2	—	—	—	—	—	—	—	—	+		—	—	—	—	—	—	+				—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» *helvolum*	—	—	—	—	+						—	—	—	—	+						—	—	—	—	—	—	+			
Sacch. cerevisiæ	—	—	—	—	—	—	—	—		+	—	—	—	—	—	—	—	+			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» *ellipsoideus*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pen. crustaceum	—	—	—	—	—	—	—	—	+		—	—	—	—	—	—	—	—	+		—	—	—	—	—	—	—	—	—	?
Asp. niger	—	—	—	—	—	—	—	+			—	—	—	—	—	—	—	—	+		—	—	—	—	—	—	—	+		
» *varians*	—	—	—	—	—	—	+				—	—	—	—	—	—	—	+			—	—	—	—	—	—	+			
Rhiz. nigricans	—	—	—	—	—	+					—	—	—	—	—	—	+				—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Tricothecium roseum	—	—	—	—	—	+					—	—	—	—	—	—	—	+			—	—	—	—	—	—	—	—	+	
Fusarium sp.	—	—	—	—	—	+					—	—	—	—	—	—	+				—	—	—	—	—	—	—	—	+	

Difatti, dal precedente quadro, si scorge come ad es. il *Bact. fluorescens liquefaciens* n. 1 scinda più rapidamente del n. 2 l'arbutina che non la salicina e non si mostri attivo dopo trenta giorni di coltura sulla fluorizina, mentre lo è, su questa, lo stipite n. 2. Anche i due *Bact. punctatum,* inattivi anch' essi sulla fluorizina, dimostrarono una diversa velocità di scissione dell' arbutina e della salicina.

In genere, però, la demolizione dei glucosidi — salvo eccezioni per la fluorizina — si verificò in tutte le colture sperimentate.

= Si è già avuto occasione di accennare che non sempre la demolizione dei glucosidi si arresta ai primi prodotti di scissione.

Si è ricordato, come fatto già noto, cosa ad es. avviene per l' amigdalina: e si è accennato al fatto, da noi osservato, della salicina che, dopo essere stata scissa la saligenina, viene trasformata in acido salicilico con ulteriore ossidazione di questo.

La demolizione degli acidi per via microrganica è cosa, invero, sufficientemente conosciuta almeno per la maggior parte dei più importanti fra essi. L' acido salicilico però, sperimentato da De Jong, non risulterebbe capace di essere utilizzato, nelle proporzioni del 5 $^0/_{00}$ da nessuna di 58 colture da lui provate (31); mentre lo sarebbe il suo isomero, acido paraidrossilbenzoico, in ispecie per opera di *Bact. aerogenes, B. vulgare, B. fluorescens, Mycobact. phlei.*

Evidentemente la non utilizzazione dell' acido da parte delle colture di De Jong deve ritenersi dipendere dalla elevata concentrazione, almeno rispetto a quella che doveva aversi nei nostri liquidi originariamente contenenti salicina.

La quantità di acido salicilico corrispondente a 2 gr. $^{0}/_{00}$ di questa è infatti uguale a gr. 0,9650 $^{0}/_{00}$; e in tale concentrazione, esso, si dimostrò utilizzato.

Per approfondire un poco tale fatto allestimmo il seguente liquido colturale:

acqua distillata	1000
tartrato ammonico	2
fosfato bipotassico	2
cloruro sodico	tr.
solfato potassico	tr.
acido salicilico	0.5

e lo inoculammo con stemperamento acquoso di terreni di diversa costituzione. Coltivammo a 24° C. e saggiammo giornalmente aliquote dei liquidi con cloruro ferrico, il quale, come è noto, dà in presenza di acido salicilico colorazione violetta.

Risultò:

Terreno	giorni occorsi per la scomparsa dell' acido salicilico									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	—	—	+							
II	—	—	—	+						
III	—	—	—	—	—	—	—	+		
IV	—	—	—	—	+					
V	—	—	—	—	—	+				
VI	—	—	—	+						

Risultò, cioè, che colture brute provenienti da terreni di diversa natura non ugualmente si comportano di fronte all' acido salicilico. Nella concentrazione sperimentata tutte comunque si manifestarono capaci di ossidarlo, ma in modo particolare, attive si dimostrarono quelle allestite con terreni argillosi (n. I), un po' meno quelle dei terreni di medio impasto (n. V e VI), meno ancora quelle dei sabbiosi (n. III).

Limitammo le ulteriori ricerche impiegando terreni argillosi e sperimentammo la diversa influenza delle sorgenti carboidrata e azotata.

Per la prima, preparato il seguente liquido colturale:

acqua distillata	1000
tartrato ammonico	2
fosfato bipotassico	2

cloruro sodico	tr.
solfato potassico	tr.
acido salicilico	0,5

furono aggiunti separatamente, saccarosìo, lattosio, glucosio, galattosio nelle proporzioni dell' 1 %. Inoculati i substrati con stemperamento acquoso di terra si coltivò a 24° C. saggiando ogni giorno aliquote dei liquidi con cloruro ferrico.

Risultò:

Idrato di carbonio aggiunto:	giorni occorsi per la scomparsa dell'acido salicilico:									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
galattosio	—	—	—	—	—	—	+			
glucosio	—	—	—	—	—	—	—	—	+	
lattosio	—	—	—	+						
saccarosio	—	—	—	—	+					

il che significa che più veloce demolizione dell' acido presentarono i substrati contenenti disaccaridi: in minor grado quelli contenenti monosaccaridi. Tale singolare comportamento, perfettamente opposto a quello che si verifica in altri fenomeni, come ad es. quello della solubilizzazione microrganica del carbonato di ferro (32), si potrebbe spiegare con il fatto che il corpo batterico deve trovare più agevole — per trarre energia respiratoria — la demolizione dell'acido anzichè dei disaccaridi più lentamente utilizzabili; mentre l' opposto deve verificarsi per i monosaccaridi, prima dell' acido demoliti.

A mezzo del liquido colturale precedentemente impiegato indagammo anche l' influenza di alcune diverse concentrazioni di zuccheri e, operando sempre nel medesimo modo, fu possibile di notare:

% di carboidrato		giorni occorsi per la scomparsa dell' acido salicilico:									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
monosaccaridi: glucosio	0,5	—	—	—	—	+					
	1	—	—	—	—	—	+				
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	+	
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
disaccaridi: saccarosio	0,5	—	—	—	+						
	1	—	—	—	+						
	2	—	—	—	+						
	5	—	—	+							

Per i disaccaridi quindi la concentrazione non avrebbe decisiva influenza, in ogni modo verificandosi, prima dell' attacco del disaccaride, la demolizione dell' acido; per i monosaccaridi invece le concentrazioni più basse si dimostrano le più opportune in quanto — come è stato visto —, l' attacco dell' acido segue alla demolizione degli zuccheri.

In quale modo agiscano le diverse sorgenti azotate, fu provato aggiungendo al liquido colturale così costituito:

acqua distillata	1000
saccarosio	2
fosfato bipotassico	2
cloruro sodico solfato potassico	tr.
acido salicilico	0,5

i seguenti composti: tartrato ammonico, nitrato potassico, solfato ammonico, urea, asparagina nei pesi corrispondenti a gr. 0,3252 $^0/_{00}$ di N — Inoculammo e coltivammo come al solito, accertandoci preliminarmente che alcuna modificazione chimica venisse provocata nei riguardi dell' acido salicilico nei liquidi contenenti i sali aggiunti.

Risultò:

Composto agg.	giorni occorsi per la scomparsa dell' acido salicilico:									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
controllo	—	—	—	—	—	—	—	—		+
asparagina	—	—	—	+						
urea	—	—	—	—	+					
tartr. amm.	—	—	—	—						
nitrato potass.	—	—	—	+						
solf. ammonico	—	—	+							

ottenendosi, cioè, più veloce demolizione dell' acido salicilico in presenza di solfato ammonico, indi di nitrato potassico, di azoto organico, di nitrato ammonico: notevolmente più lenta essa fu nel controllo.

L' attività di alcune forme microrganiche rimase evidente, al riguardo, sino dalle prove condotte sulla salicina. Coltivando comunque le diverse specie in presenza di acido salicilico se ne ebbe conferma.

CONCLUSIONI

Da quanto è stato esposto risulta, in primo luogo, confermata la capacità che molti microrganismi presentano di scindere idroliticamente alcuni glucosidi. Avendo sperimentato con colture brute provenienti da diversi terreni risulta anche chiarito che, tale scissione, è in dipendenza della natura dei diversi suoli e, più che del numero dei microbi in essi contenuto, del grado di attività delle singole specie. Che quelle sperimentate, tutte — ora più, ora meno velocemente — si dimostrarono capaci di scindere l' arbutina e la salicina mentre non tutte la fluorizina.

Che sulla scissione di tali glucosidi esercitano influenza negativa aggiunte di zuccheri, particolarmente disaccaridi, mentre favorevolmente agiscono le sorgenti azotate.

Si è ammesso inoltre l' ipotesi, avvalorandola con dati sperimentali, che i glucosidi esplicano per i microrganismi funzione trofica e quindi rappresentano per questi ottima sorgente alimentare.

Infine, nei riguardi della salicina, è stato posto in evi-

denza come dalla saligenina che ne deriva si passi ad acido salicilico, ulteriormente anch' esso demolito.

Particolarmente indagando l' ossidazione di questo si è stabilito che, in piccole concentrazioni, esso può essere utilizzato dai microbi del suolo, con maggiore o minore intensità a seconda della natura del terreno; e che altresì, tale utilizzazione, non è favorevolmente influenzata da aggiunte di carboidrati mentre lo è da quella di sali azotati.

Dal Laboratorio di Batteriologia
del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa

giugno 1931 - IX

BIBLIOGRAFIA

(1) v. E. F. Armstrong. — *The simple carbohydrates and glucosides.* London, 1919. — G. Trier. *Chemie der Pflanzenstoffe*, Berlin, 1926.

(2) E. Bourquelot e H. Hérissey. — *Action de l'émulsine de l'Asp. niger sur quelques glucosides.* Bull. Soc. Mycol. France. *11*, 1895.

(3) I. Van der Leck. — *Aromabildende Bakterien in Milch.* C. B. *17*, 1906.

(4) M. Gonnermann. — *Die Wirkung einiger Enzyme und Darmbakterien auf einiger Glukoside und Alkaloide.* Apoth. Ztg. *21*, 1906.

(5) F. W. Twort. — *The fermentation of glucosides by bacteria of the typhoid coli group and the acquisition of new fermenting powers by Bac. dysenteriæ and other micröorganisms.* Proc. Roy. Soc. London, ser. B. *79*, 1907.

(6) A. W. Dox. — *The intracellular enzymes of Penicillium and Aspergillus.* Bul. 120 Bur. Animal, U. S. Dept. Agr. 1910.

(7) A. Brunstrein. — *Ueber Spaltungen von Glycosiden durch Schimmelpilze.* Bot. Cent. Beihefte, *10*, 1911.

(8) T. A. Henry e S. J. M. Auld. — *On the probable existence of emulsin in yeast.* Proc. Roy. Soc. Ser. B. *76*, 1905.

(9) A. Weintraub. — *Ueber Glukosidspaltung durch Bakterien der Coli-gruppe.* C. B. *91*, 1924.

(10) C. Fermi e G. Montesanò. — *Ueber die Dekomposition des Amygdalins durch Mikroorganismen.* C. B. *15*, 1894.

(11) E. Gèrard. — *Sur le dédoublement de l' amygdaline dans l'economie.* C. R. Soc. Biol. *48*, 1896.

(12) Op. cit.

(13) Op. cit.

(14) Op. cit.

(15) R. I. Caldwell e S. L. Courtland. — *Studies on enzyme action. IX. The enzymes of yeast: amigdalase.* Proc. Roy. Soc. Ser. B. *79*, 1907.

(16) C. H. Crabill e H. S. Reed. — *Convenient methods for demostrating the biochemical activity of micröorganisms, with special reference to the production and activity of enzyme.* Bioch. Bul. *4*, 1915.

(17) E. Gèrard. — *Précence dans le Pen. glaucum d' un ferment agissant comme l' emulsin.* C. R. Soc. Biol. *45*, 1893.

(18) K. Puriewitsch. — *Ueber die Spaltung der Glycoside durch die Schimmelpilze.* Ber. Deut. Bot. Gesell., *16*, 1898.

(19) Op. cit.

(20) Op. cit.

(21) E. Bourquelot. — *La syntèse des glucosides a l' aide de l'emulsin.* Paris, 1912.

(22) M. Javillier e H. Tchernokowtsky. — *L'amigdalase et l'amigdalinase chez l'Asp. niger et quelques hyphomycètes voisins.* Ann. Inst. Pasteur, *27*, 1913.

(23) Op. cit.

(24) W. H. Harrison e v. der Leck I. — *Aesculin bile salt media for water analysis.* C. B. *22*, 1909.

(25) K. Meyer e H. Schönfeld. — *Ueber die Unterscheidung des Enterococcus von Streptococcus viridans und die Beziehungen beider zum Str. lactis.* C. B. *92*, 1909.

(26) Op. cit.

(27) E. Alvarez. — *Sur un nouveau microbe dèterminant la fermentation indigotique et la production de l' indigo bleu.* C. R. *105*, 1887.

(28) H. Molisch. — *Botanische Beobachtungen auf Java — Ueber die sogenannte Indigogährung und neue Indigopflanzen.* Sitzber. K. Akad. Wiss. (Wien). Math. Naturw. Kl. *107*, 1898 — [l'A. ricorda come non sarebbero risultati attivi *Staphylococcus aureus, Bac. subtilis, Bact. coli, Pseudom. fluorescens, Bac. megatherium* e alcuni fermenti].

(29) Op. cit.

(30) Si veda, per ulteriori notizie, quanto in : R. E. Buchanan e E. Fulmer. — *Physiology and Biochemistry of Bacteria*. Vol. III, p. 73 e seg., 1930.

(31) L. F. De Jong. — *Beijdrage, tot de Kennis van het Mineral proces*. Delft, 1926.

(32) O. Verona. — *Sulla solubilizzazione microrganica del carbonato di ferro*. Boll. del R. Ist. Sup. Agr. di Pisa, 1930 ; e Boll. d. Soc. Int. di Microbiologia, fasc. VI e X, 1330.